

クモラン (*Taeniophyllum aphyllum*) の菌根菌同定と共生培養

¹⁾谷亀 高広* ²⁾大和 政秀

¹⁾ 高森町蘭植物園 〒399-3107 長野県下伊那郡高森町出原 512-73

²⁾(株)環境総合テクノス環境部〒541-0052 大阪府大阪市中央区安土町 1-3-5

Identification of mycorrhizal fungi and symbiotic cultures of *Taeniophyllum aphyllum* (Makino)

Makino

¹⁾Takahiro YAGAME* ²⁾Masahide YAMATO

¹⁾Orchid Museum, Takamori 512-73 Izuhara, Takamori, Shimoina, Nagano Pref. 399-3107 JAPAN

²⁾ Environment Department, The General Environmental Technos Co., Ltd.

1-3-5 Azuchimachi Chuo-ku, Osaka, Osaka Pref. 541-0052 JAPAN

Abstract

Mycorrhizal fungi were isolated from an epiphytic orchid, *Taeniophyllum aphyllum*. Among the fungal isolates, the identity of DNA sequences of the ITS region were quite high, 99.5-100% even though the geographically separated sampling. A neighbor-joining phylogenetic analysis based on the DNA sequence showed that the all isolates were *Ceratobasidium*. It was also found that the isolates were nearly related to mycorrhizal fungi of American and Asian epiphytic orchids. They were distinct from mycorrhizal fungi of terrestrial orchid in the phylogenetic analysis. Seed germination and seedling culture were conducted in asymbiotic and symbiotic conditions. In the symbiotic culture, three selected fungal strains were applied. Seed germination rate and seedling growth were better in symbiotic conditions than asymbiotic ones. The growth rate of symbiotic seedling was higher than a former record of natural seedlings. It was supposed that the available carbons for mycorrhizal fungi in the symbiotic culture medium would have effect on the seedling growth.

緒言

自生地におけるラン科植物は、発芽や幼植物体の生育に必要な炭素源を、菌根菌からの供給に依存している (Smith and Read 2008)。この性質は、地上に生育する地生ランばかりでなく、樹上の着生ランにもみられる (Suarez et al. 2006)。着生ランの多くは、腐生性の *Rhizoctonia* 属菌と共生し、Ceratobasidiaceae が、*Thrixsperмум congestum*, *Trichoglottis australiensis* (Roberts 1999), *Campylocentrum fasciola* (Otero et al.

2002) などの菌根菌として、また、Tulasnellaceae が、*Taeniophyllum obtusum* (Irawati 1993), *Epidendrum rigidum*, *Polystachya concreta* (Pereira et al. 2005) などの菌根菌として、それぞれ報告されている。*Sarcochilus roseus*, *S. hartmanii* (Clements 1987), *Tolumnia variegata*, *Ionopsis utricularioides*, (Otero et al. 2004, Otero et al. 2005) などについては菌根菌の同定だけでなく共生培養試験も実施されているが、このような研究事例は少なく、着生ランの菌根共生

については依然として不明の点が多い。

クモラン (*Taeniophyllum aphyllum*) (図1) は葉を持たない着生ランで、本州西部、四国、九州に分布する (Maekawa 1971)。樹木の枝に着生し、本



図1:クモランの自生状況。

州の自生地では6~7月に開花し、翌年3月頃に果実から種子を飛散させる。クモラン属は世界中に150種が知られているが、すべての種が葉を持たず、根の皮層組織にみられる葉緑体が光合成を行っている。Burgeff (1935) はクモラン属の *T. tjibodasanum* について、幼植物体に葉状体 (leaf-like organ) と呼ばれる組織を観察しており、この葉状体はクモランについても Mutsuura and Nakahira (1961) による観察例がある。本研究では、クモランから菌根菌を分離し、rDNA の ITS 領域の塩基配列から分離菌株の同定を行うとともに、分離菌株を用いた共生培養も併せて実施した。

材料および方法

植物体のサンプリングおよび菌根菌の分離

静岡県静岡市平野 (標高 210 m)、および静岡県静岡市有東木 (標高 412 m) の農園で栽培されているウメ (*Prunus mume*) の枝、京都府京都市左京区 (標高 152 m) の照葉樹林に自生するアラカシ (*Quercus glauca*) の枝に着生するクモランから根を採集した。菌根菌の分離は Warcup and Talbot (1967) の手法を一部改変して行った。クモランの果実は静岡市平野において2005年10月にウメの枝に着生する個体から採取し、共生培養と無菌培養に供試した。

分離菌株の分子同定

分離した菌根菌は PDA 培地で培養し、培養菌糸から DNA を抽出した。続いて、rDNA の ITS 領域を ITS1F と ITS4 のプライマーを用いた PCR 反応 (Gardes and Bruns 1993) によって増幅した。PCR 産物はクローニング後、シーケンスを行った。シーケンスデータは DDBJ に登録し、BLAST searches (Altschul et al. 1997) による相同性検索を行った。相同性の高いシーケンスデータについては DDBJ/EMBL/GenBank データベースからダウンロードし、クモランの菌根菌より得られた塩基配列データとともにアライメントして近隣結合法 (Saitou and Nei 1987) による系統樹を作成した。

種子の無菌培養、および共生培養

共生培養には、H1OAT 培地 (Rasmussen et al. 1990) を供試した。一方、無菌培養には BM1 培地 (van Waes and Debergh 1986) を用いた。これらの培地を約 20 ml ずつ用いて直径 9 cm の滅菌シャーレに培地プレートを作成し、その上でクモランを培養した。種子は、果実を採取したその日のうちに播種し、果実を有効塩素濃度 1% の次亜塩素酸ナトリウムで 1 分間表面殺菌した後、無菌的に種子を取り出し、播種した。また、無作為に選抜した 10 粒について長径と短径を測定し、それぞれの平均値を求めた。分離菌株について、3 地点のサンプリング箇所ごとに、PDA 上での生育が最もよかった菌株 H-8 (静岡県静岡市平野産)、U1-4 (静岡県静岡市有東木産)、K-6 (京都府京都市左京区産) を共生培養に供試した。各菌株を PDA 培地上で 30 日間培養して接種源を作成し、クモランの種子を播種した H1OAT 培地上へ 5×5 mm の大きさに切り抜いた接種源を置床した。また、菌根菌無接種区 (H1OAT 培地) および無菌培養区 (BM1 培地) を試験区として設けた。それぞれの試験区は 5 反復とし、20.0±0.5、12 時間日長 (45 μmol/m²s) の条件で培養を行った。種子発芽と成長の観察は実体顕微鏡を用いて 1 ヶ月毎に行った。種子発芽は肥大した胚が種皮を破っ

た段階と定義した。また、それぞれのシャーレの中でもっとも大きく生長した苗を 10 個体選び出して長径を測定した。

実生苗の共生培養

静岡市平野で 2005 年 10 月に採集した種子を BM1 培地プレートに播種し、上記の条件で 1 年間培養後、成長が良好で、根の未発達な個体を共生培養に供試した。共生培養には H-8、U1-4、K-6 を接種する試験区と菌根菌無接種区を設け、それぞれ 5 反復とした。接種源の準備や共生培養の手法は、種子の共生培養法に準じて行い、培養 5 ヶ月後に、実生苗の長径、生重量、および発生した根の長さを計測した。

統計解析

発芽率、実生苗の長径、実生苗の生重量の値について Tukey's test による統計解析を行った。

結果

菌根菌の分離、および分子同定

根は静岡市平野で 1 個体、静岡市有東木で 2 個体、京都市で 1 個体の計 4 個体からそれぞれ 1 本ずつを採取した。菌根菌の感染が根の皮層で観察され、計 37 系統の菌根菌が分離された(表 1)。rDNA の ITS 領域の塩基配列から、すべての菌株間で高い相同性があることが明らかとなり(99.5-100%)、系統解析の結果から、分離された菌根菌はすべて *Ceratobasidium* 属に属することが明らかとなった。また、分離菌株は中米に自生する着生ランである *Ionopsis satyroides*, *I. utricularioides* および *Tolumnia variegata* の菌根菌や、東南アジアに分布する着生ランを元に、交配され作出された園芸品種である *Arachnis Maggie Oei* および *Aranda Brite Ng* の菌根菌に近縁であることも明らかとなった。一方、地生ランである *Pterostylis nutans*, *Dactylorhiza hatagirea*, *Orchis laxiflora*, ヒメノヤガラ(*Chamaegastrodia sikokiana*)から分離された *Ceratobasidium* 属の菌

とは異なるクレイドを形成していた(図 2)。

表1:クモランからの分離菌株

分離菌株番号*	採集日	DDBJ accession no.
H-1	2005.5.17	AB449169
H-2	2005.5.17	AB449170
H-3	2005.5.17	AB449171
H-4	2005.5.17	AB449172
H-5	2005.5.17	AB449173
H-6	2005.5.17	AB449174
H-7	2005.5.17	AB449175
H-8	2005.5.17	AB449176
H-9	2005.5.17	AB449177
H-10	2005.5.17	AB449178
U1-1	2005.5.17	AB449179
U1-2	2005.5.17	AB449180
U1-3	2005.5.17	AB449181
U1-4	2005.5.17	AB449182
U1-5	2005.5.17	AB449183
U1-6	2005.5.17	AB449184
U1-7	2005.5.17	AB449185
U1-8	2005.5.17	AB449186
U1-9	2005.5.17	AB449187
U2-1	2005.5.17	AB449188
U2-2	2005.5.17	AB449189
U2-3	2005.5.17	AB449190
U2-4	2005.5.17	AB449191
U2-5	2005.5.17	AB449192
U2-6	2005.5.17	AB449193
U2-7	2005.5.17	AB449194
U2-8	2005.5.17	AB449195
U2-9	2005.5.17	AB449196
U2-10	2005.5.17	AB449197
K-1	2005.10.31	AB449198
K-2	2005.10.31	AB449199
K-3	2005.10.31	AB449200
K-4	2005.10.31	AB449201
K-5	2005.10.31	AB449202
K-6	2005.10.31	AB449203
K-7	2005.10.31	AB449204
K-8	2005.10.31	AB449205

H, 平野; U1, 有東東地点1; U2, 有東東地点1; K, 京都

*分離番号は採集地、分離菌株番号を指す。

種子発芽と実生苗のその後の生長

胚に緑色色素が観察されたことから、クモランの種子には光合成色素が存在すると考えられた。種子の長径および短径の平均はそれぞれ 170 μm, 37 μm であった。播種 1 ヶ月後、発芽率はすべての試験区で 80%を超え、菌根菌無接種区(H10AT 培地)の発芽率は無菌培養区(BM1 培地)よりも高かった(表 2)。菌根菌を接種した試験区では、播種 3 ヶ月後には、全試験区で、すべての種子が発芽した。播種 1 ヶ月後、菌根菌接種区の実生苗は葉状体に発達した。葉状体には仮根の発達が観察された(図 3A)。実生苗の成長は K-6 接種区で最もよく、播種 5 ヶ月後に長径が 2.5 mm に達した(表 3)。一方、無菌培養区では、播種 1 ヶ月後に仮根の原基がようやく発達し始めた(図 3B)。菌根菌無接種区では、播種 1 ヶ月後に胚の肥大による種皮の裂開、すなわち発芽初期の段階が観察されたものの(図 3C)、葉状体への

成長、仮根および気孔の発達は播種後 5 ヶ月が経過しても認められなかった(図 3D)。

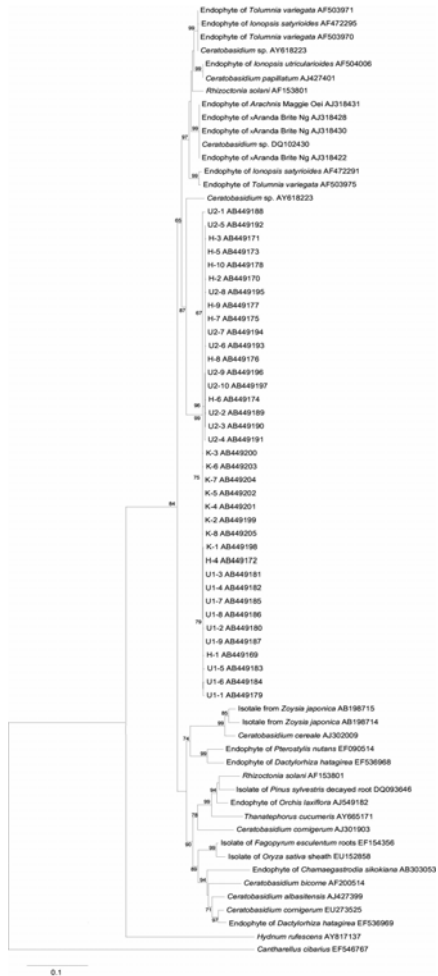


図2:クモランの菌根菌とCeratobasidiaceaeの系統樹。外群はCantharellus cibariusとHydnum rufescensとした。ブートストラップ値は65%以上を表示した。

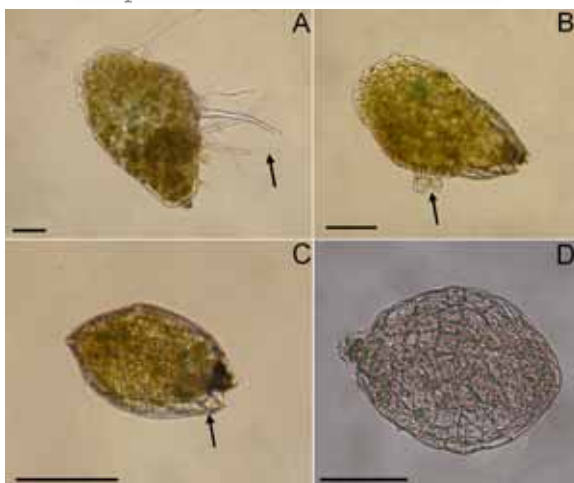


図3: 平板培地上で生育するクモランの実生苗
A: HIOAT培地上で分離菌株K-6と共に播種後1ヶ月間共生培養した個体。矢印:仮根、Bar=1 mm B:無菌培養(BM1培地)条件下で播種後1ヶ月間培養した個体。矢印:仮根の原基、Bar=1 mm C:播種後1ヶ月培養した実生苗(無接種区)。胚が種子を破っている。矢印:種皮、Bar=1 mm D:播種後5ヶ月培養した実生苗(無接種区)。仮根も気孔も形成されていない。Bar=1 mm

実生苗の共生培養

BM1 培地において1年間培養された実生苗を用いた共生培養試験では、5 ヶ月後に根の形成がみられた(図4 A)。共生培養試験区の実生苗の生重量は 95 ~ 132 mg となり、根長の総計は H-8 接種区で有意に大きな値となり 48.1 mm に達した(表 4)。共生培養区の葉状体は淡黄色から鮮やかな緑色に変化したが、菌根菌無接種区の葉状体は淡黄色のまま、わずかに根の発生が確認されるにとどまった(図4 B)。

表2.クモランの種子発芽率 (平均値 ± SD)

供試培地	接種菌株番号	播種後の月数			
		1	2	3	4
HIOAT	H-8	100 ^a ± 0	100 ^a ± 0	100 ^a ± 0	100 ^a ± 0
HIOAT	U1-4	97.4 ^a ± 0.9	99.2 ^a ± 0.75	100 ^a ± 0	100 ^a ± 0
HIOAT	K-6	94.9 ^a ± 2.1	97.8 ^a ± 1.4	100 ^a ± 0	100 ^a ± 0
HIOAT	-	91.9 ^a ± 3.1	93.1 ^a ± 4.1	94.3 ^a ± 4.3	95.6 ^a ± 3.4
BM1	-	81.7 ^b ± 5.2	82.6 ^b ± 4.9	85.0 ^b ± 5.6	87.2 ^b ± 5.8

各調査月において、発芽率データの右上のアルファベットが同一のものは、Tukey's testによって有意差がなかったものを示している。(P<0.05)

表3.クモランの実生苗の長径(mm) (平均値±SD)

培地	接種菌株番号	播種後の月数				
		1	2	3	4	5
HIOAT	H-8	0.47 ^a ± 49.8	1.01 ^b ± 186.7	1.04 ^b ± 92.6	1.26 ^c ± 82.3	1.42 ^c ± 100.7
HIOAT	U1-4	0.42 ^a ± 12.6	1.43 ^b ± 35.9	1.56 ^b ± 110.5	1.69 ^b ± 98.7	1.99 ^b ± 66.3
HIOAT	K-6	0.41 ^a ± 28.8	1.01 ^b ± 34.2	1.51 ^a ± 71.6	2.51 ^a ± 176.3	2.61 ^a ± 147.3
HIOAT	-	0.18 ^c ± 8.3	0.18 ^c ± 9.4	0.22 ^d ± 6.5	0.25 ^d ± 9.4	0.26 ^e ± 8.7
BM1	-	0.31 ^b ± 13.9	0.42 ^b ± 21.9	0.54 ^c ± 19.7	0.78 ^d ± 51.7	0.85 ^d ± 68.9

各調査月において、実生苗長径データの右上のアルファベットが同一のものは、Tukey's testによって有意差がなかったものを示している。(P<0.05)

考察

クモランの菌根菌は *Ceratobasidium* 属と同定され、地理的に離れた地域に分布する個体から分離されたにもかかわらず、37系統すべてに高い相関性が見られた。この結果から、クモランがこの一群の菌類に対して高い特異性を持ち、菌根共生していることが示唆された。また系統解析から、クモランの菌根菌はプエルトリコに分布する着生ランである *Ionopsis utricularioides* (Otero et al. 2002)や *Tolumnia variegata* (Otero et al. 2005)、とによって作出された *Arachnis* Maggie Oei や Aranda Brite Ng の菌根菌に比較的近縁であり、これらの着生ランの菌根菌は、地生ランに共生する *Ceratobasidium* 属菌とは系統樹の中で異なったクレイドを形成することが明らかとなった。Suarez et al. (2006) は南米に分布する着生ランの *Stelis* spp. および *Pleurothallis lilijae* の菌根菌を調査し、Tulasnellaceae と同定した。さらに、これらの着生ランの菌根菌は地生ランから分離された

Tulasnellaceae とは類縁性が低いことを明らかにし、着生ランとの菌根共生に対して分化した Tulasnellaceae の存在を示した。今回の研究結果から、Ceratosidiaceae においても着生ランとの共生に対して分化した菌群が存在することが示唆された。

クモランの種子は高い発芽率を示し、種子休眠の性質を持たないことが明らかとなった。温帯性の地生ランでは種子休眠がみられる種が多いが (Rasmussen 1995)、着生ランでは一般に種子休眠を示す種は知られていない (Arditti 1992)。

表4. クモランの共生培養苗の全根長、葉状体の長径および生重。BM1培地で1年間無菌培養した苗をH10AT培地における共生培養に供試し、5ヶ月後に測定を行った。(平均値±SD)

感染菌株番号	全根長 (mm)	葉状体の長径 (mm)	生重 (mg)
Control	5.4 ^b ± 7.40	10.6 ^a ± 1.51	28.6 ^a ± 0.01
H-8	41.4 ^a ± 29.3	11.8 ^a ± 3.03	112.6 ^a ± 0.06
U1-4	19.2 ^b ± 13.6	12.8 ^a ± 4.44	131.8 ^a ± 0.04
K-6	28.0 ^b ± 16.7	15.2 ^a ± 6.14	95.2 ^a ± 0.11

データの右上のアルファベットが同一のものは、Tukey's testによって有意差がなかったものを示している。(P<0.05)



図4: BM1培地上で1年間、前培養された後、H10AT培地にて5ヶ月培養された実生苗。A: H-8接種区において共生培養された苗。葉状体や根の発達を確認でき、色は鮮緑色に変化した。矢印: 根、Bar=1 cm B: 無接種区。葉や葉状体の発達が悪く、色は淡黄色のまま変化しなかった。矢印: 根 Bar=1

種子発芽率および実生苗の成長は、共生培養区が無菌培養区と比べ良好であった。これは、実験に供試された菌株が種子発芽や、実生苗の成長を促進したことを意味している。このような菌根菌による生長促進効果は様々なランで報告されている (Zettler and McInnis 1994)。

発芽後、クモランの実生苗は葉状体に生長した。Mutsuura and Nakahira (1961) は発達した葉状体について、組織表面に気孔がみられたことから、葉に代わる器官であると考えた。Mutsuura et al. (1962) は、自生地におけるクモランの実生苗の成長の様子を観察し、クモランはスギの葉の上で発芽することを明らかにした。このため枝の年輪が実生苗の発芽からの年数を示すことがわかり、葉

状体の長径が1 cm に達し発根するまでに約7年を要することが明らかとなった。枝の上で、菌根菌からクモランに与えられる炭素の供給源は樹皮と考えられるが、樹皮は難分解性であるため供給供給量が乏しいものと考えられる。胚や根に葉緑素を持つことは不十分な炭素供給を補完する必要性から進化した性質なのであろう。

Mutsuura et al. (1962) は、ココナッツミルクやペプトンを加えた Knudson C 培地でクモランを種子から無菌培養条件下で培養し、播種6か月後に実生苗が約0.5 mm まで成長したことを報告している。今回の研究では共生培養区(K-6接種区)で、葉状体は播種5か月後に2.5 mm にまで成長した。さらに、1年間無菌培養した苗に対して行った共生培養試験ではH-8接種区で5か月後(播種17ヶ月後)に根の長さが総計40 mm 以上に達した。このように人工培地上での実生苗の成長が自生地における成長と比べて早いのは、培地の分解されやすい炭素源が菌根菌を通じて植物体に潤沢に供給されたことに起因するものと考えられた。

謝辞

静岡県在住の西口 紀雄氏にはクモランの自生地情報、およびサンプリングにご助力をいただいた。また奥田 枝穂氏にはDNA抽出、解析にご助力をいただいた。以上の方々に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Arditti J (1992) Fundamentals of orchid biology. John Wiley and Sons, New York
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402
- Burgeff H (1935) Samenkeimung der Orchideen. Gustaw Fischer verlag, Jena
- Clements MA (1987) Orchid-fungus-host

- associations of epiphytic orchids. In: Proceedings of the 12th World Orchid Conference (ed. Saito K, Tanaka R), pp.80-83. Japanese Orchid Council Tokyo.
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2: 133-118
- Irawati (1993) Orchid mycorrhizal in *Taeniophyllum obtusum* L.J. *Biol Indosina* 1: 6-16
- Maekawa F (1971) The wild orchids of Japan in color. Seibundo-shinkosha, Tokyo, In Japanese with English summary.
- Mutsuura O, Nakahira R (1961) Morphological studies on *Taeniophyllum aphyllum* (Makino) Makino with special reference to the structure of the flower stalk, the root the leaf. *Sci Rep Kyoto Pref Univ* 3: 141-149 (in Japanese with English summary)
- Mutsuura O, Ito I, Nakahira R (1962) Studies on the germination and the development of seedlings of *Taeniophyllum aphyllum* (Makino) Makino. *Sci Rep Kyoto Pref Univ* 3: 189-194 (in Japanese with English summary)
- Otero JT, Ackerman JD, Bayman P (2002) Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchid. *Am J Bot* 89: 1852-1858
- Otero JT, Ackerman JD, Bayman P (2004) Diversity in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Mol Ecol* 13: 2393-2404
- Otero JT, Bayman P, Ackerman JD (2005) Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* in vitro: the potential for natural selection. *Evol Ecol* 19: 29-43
- Pereira OL, Kasuya MCM, Borges AC, de Araujo EF (2005) Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil *Can J Bot* 83: 54-65
- Rasmussen HN, Andersen TF, Johansen B (1990) Temperature sensitivity of in vitro germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant Cell and Environ* 13: 171-177
- Rasmussen HN (1995) Terrestrial orchid from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press, Cambridge
- Roberts P (1999) *Rhizoctonia*-forming fungi. A Taxonomic guide. The Herbarium, Royal Botanic Gardens, Kew.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425
- Smith SE, Read DJ (2008) Mycorrhizal symbiosis (third edition) Academic Press, New York, USA
- Suarez JP, Weiß M, Abele A, Garnica S, Oberwinkler F, Kottke I (2006) Diverse tulasnelloid fungi from mycorrhizas with epiphytic orchid in an Andean cloud forest. *Mycol Res* 110: 1257-1270
- van Waes JM, Debergh PC (1986) In vitro germination of some Western European orchids *Physio Plant* 67: 253-261
- Warcup JH, Talbot PHB (1967) Perfect states of *Rhizoctonias* associated with orchids. *New Phytol* 66: 631-641
- Zettler LW, McInnis TM Jr. (1994) Light enhancement of symbiotic seed germination and development of an endangered terrestrial orchid (*Platanthera integrilabia*). *Plant Sci* 102: 133-138